

PRODUCTION OF PARTICLE OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS @ (3754/24)IBDV HAVING PROTECTIVE ANTIGENICITY

Publication number: JP5194597

Publication date: 1993-08-03

Inventor: KATO ATSUSHI

Applicant: NIPPON SEIBUTSU KAGAKU KENKYUS

Classification:

- International: A61K39/12; A61P31/12; C07K14/005; C07K14/195;
C12N7/00; C12N15/09; C12N15/41; C12P21/02;
G01N33/569; C12R1/91; A61K39/12; A61P31/00;
C07K14/005; C07K14/195; C12N7/00; C12N15/09;
C12N15/40; C12P21/02; G01N33/569; C12P21/02;
(IPC1-7): A61K39/12; C07K15/04; C12N7/00;
C12N15/41; C12P21/02; G01N33/569

- European:

Application number: JP19910339013 19911220

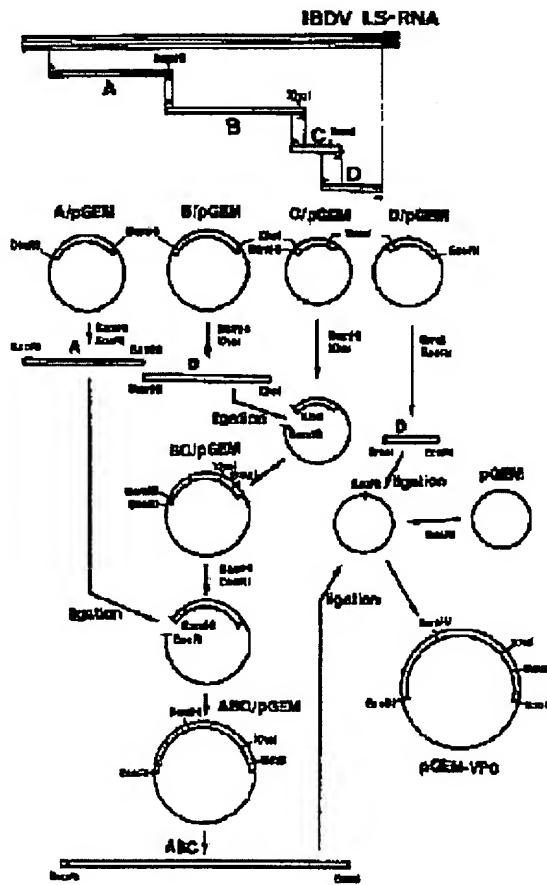
Priority number(s): JP19910339013 19911220

[Report a data error here](#)

Abstract of JP5194597

PURPOSE: To obtain a vaccine effective on protection against infection of infectious bursal disease virus(IBDV), a producing method thereof and examining and diagnosing method for detecting existence of IBDV antibody in blood or body fluid of a chicken.

CONSTITUTION: A vector integrated with a gene coding all of cleavage type virus structural proteins (VP2, VP3 and VP4) of IBDV or at least either one thereof is manifested in a host cell and the obtained protein particles are used as an active ingredient to produce a vaccine. IBDV infection of a chicken is examined and diagnosed by immunologically detecting existence of IBDV in blood or body fluid of the chicken using the above-mentioned protein particles.



Best Available Copy

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-194597

(43) 公開日 平成5年(1993)8月3日

(51) Int.Cl.⁵ 識別記号 廷内整理番号 F I
C 0 7 K 15/04 8619-4H
A 6 1 K 39/12 A F E 8413-4C
C 1 2 N 7/00 7236-4B
C 1 2 P 21/02 Z N A C 8214-4B
8931-4B C 1 2 N 15/00 A
審査請求 未請求 請求項の数4(全15頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-339013

(22) 出願日 平成3年(1991)12月20日

(71) 出願人 000173865

財団法人日本生物科学研究所
東京都青梅市新町2221番地1

(72) 発明者 加藤 篤
東京都西多摩郡羽村町富士見平1-18 羽
村団地9-508

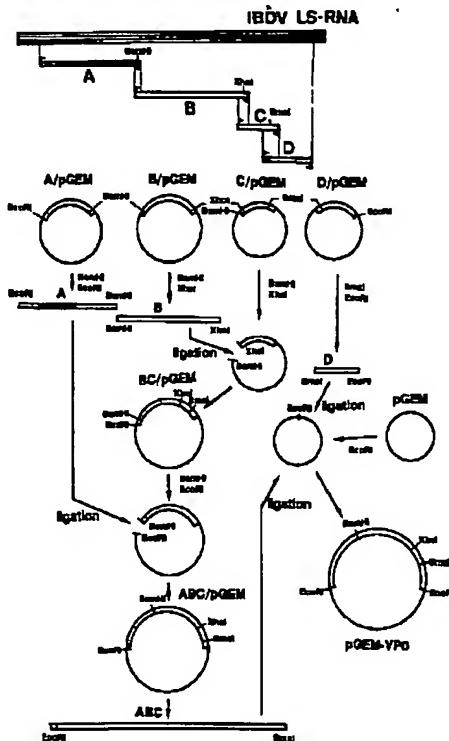
(74) 代理人 弁理士 本多 小平 (外4名)

(54) 【発明の名称】 防御抗原性を有する伝染性ファブリキウス囊病ウイルス (IBDV) の粒子製造法

(57) 【要約】

【目的】 伝染性ファブリキュウス囊病ウイルス (IBDV) の感染防御に有効なワクチン、及びその製造法、並びに上鶏の血液又は体液中の IBDV 抗体の存在を検出する検査診断方法を提供する。

【構成】 IBDV の開裂型ウイルス構造蛋白質 (VP2, VP3, VP4) の全部又はこれらの少なくともいずれか一つをコードする遺伝子を組み込んだベクターを宿主細胞で発現させ、得られた蛋白質粒子を有効成分としてワクチンを製造する。また上記蛋白質粒子を用いて、鶏の血液又は体液中の IBDV 抗体の存在を免疫学的に検出することで鶏の IBDV 感染を検査診断する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 伝染性ファブリキウス囊病ウイルスの開裂型ウイルス構造蛋白質（VP-2, VP-4, VP-3）の全部、又は該開裂型ウイルス構造蛋白質のうちの（VP-2, VP-4, VP-3）の少なくともいずれか一つと、免疫学的に反応する部分を含むことを特徴とする蛋白質粒子。

【請求項2】 伝染性ファブリキウス囊病ウイルス（IBDV）の開裂型ウイルス構造蛋白質の全部、又は該開裂型ウイルス構造蛋白質のうちの（VP-2, VP-4, VP-3）の少なくともいずれか一つの部分、をコードする遺伝子を組み込んだベクターを、宿主細胞に導入して発現させ、発現したIBDVの構造蛋白質を自己集合させることを特徴とする請求項1に記載の蛋白質粒子の製造法。

【請求項3】 請求項1に記載の蛋白質粒子を有効成分とする鶏の伝染性ファブリキウス囊病に対する抗IBDワクチン。

【請求項4】 請求項1に記載の蛋白質粒子を抗原として、被検体の鶏から採取した血液中又は体液中の成分とこの抗原とを免疫学的に反応させ、該血液中又は体液中のIBDV抗体の存在を免疫学的に検出することを特徴とする鶏のIBDV感染を検査診断する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ビルナウイウイルス科に属する伝染性ファブリキウス囊病ウイルス（IBDV）の開裂型ウイルス構造蛋白質（VP2, VP4, VP3）の全部、又はその一部から成る蛋白質粒子、その蛋白質粒子の製造法、及びその粒子の利用方法に関するものであり、更に詳しくは、IBDVを構成する蛋白質であるVP2, VP3, VP4の各蛋白質をコードする第一分節cDNA全域、若しくはその一部の遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入した細胞を培養し、発現させ、前駆体蛋白質を開裂させることにより得られる成熟蛋白質によって構成される粒子を製造する方法、そのようにして製造された粒子を有効成分とするワクチン、及び検査診断薬に関するものである。

【0002】

【発明の背景】 伝染性ファブリキウス囊病ウイルス（IBDV）は1962年に初めて分離、報告されたウイルスである。本ウイルスは弱齢の鶏（3週齢以下）に対してファブリキウス囊の萎縮を引き起こす。一般的には、この段階での死亡率は10%またはそれ以下でそれほど重大ではない。しかし、ファブリキウス囊の萎縮に伴って鶏の免疫抑制が現れ、2次感染による死亡率は無視できない程に上昇する。本ウイルス病は現在、世界中に蔓延していると考えられているが、ワクチンが開発され、その計画的利用によりわが国での大規模な発生はしばらくの間収まっていた。近年、欧州で報告があった死亡率

の高い新しい型のIBDVの発生がわが国にも認められ、より効果的なワクチンが求められるようになっている。

【0003】 本病による養鶏業界の経済的損失を最小限度にとどめるには、多量の効果的で安価なワクチンの供給と接種されたワクチンが鶏に有効に働いたか否かを迅速に判定する検査が非常に重要である。現在までの細胞培養による製造方法では、人手にたよるところが多く大規模化、低価格化には限界がある。同様に、診断薬の安定供給と高品質化にも限界がある。

【0004】

【従来の技術】 ところで、従来のワクチン、診断法と組換えウイルスについては以下の様にまとめられる。

【0005】 (1) IBDVワクチン

IBDV感染症の制御はワクチン接種に大きく基づいている。IBDVの発症防御は特に影響の大きい弱齢の鶏に対して重要である。当初は野外で流行しているウイルスの懸濁液をそのまま幼雛に接種することで野外の需要に対応していた [エドガー (Edgar)、S. A. とチョー (Cho)、Y. 、ポウルトリーサイエンス (Poul t. Sci.)、44:1366 (1965)、スネデッカー (Sunedeker)、C. ら、アビアン・ディジーズ (Avian Disease)、11:519-528 (1967)]。これらのワクチンは野外でのIBDVの発生を減少させるには成功したが、ファブリキウス囊の萎縮、体重減少と時には接種した鶏を死亡させたりした [エドガー (Edgar)、S. A. とチョー (Cho)、Y. 、ポウルトリーサイエンス (Poul t. Sci.)、52:492-497 (1973)]。そこでこれらのワクチンの使用はIBDVで汚染している地域で、且つ親鶏の雛への移行抗体がある場所に限定して使われることになった。

【0006】 その後、鶏胚や培養細胞に順化したウイルス株が副作用のない新しいワクチンとして期待とともに開発され始めた [ウインターフィールド (Winterfield), R. W. アビアン・ディジーズ (Avian Disease)、13:548-557 (1969)、ライナルディー (Rainaldi)、A. ら、アビアン・パソロジー (Avian Pathol.)、3:51-57 (1974)、ルカート (Lukert)、P. D. ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・ベテリナリー・リサーチ (Amer. J. Vet. Res.)、36:539-540 (1975)など]。しかしながら、こうして開発されたワクチンのうちのいくつかは幼雛に接種すると依然として臨床症状や、ファブリキウス囊の障害を示した [ホプキンス (Hopkins)、I. G. ら、リサーチ・ベテリナリー・サイエンス (Res. Vet. Sci.)、27:260-261 (1979)、エドワーズ (Edwards)、S. A. ら、リサーチ・ベテリナリー・サイエンス (R

es. Vet. Sci.)、32:79-83(1982)】。他のいくつかのワクチンは期待通りに弱毒化された。すなわち、臨床症状は全く示さず、ファブリキウス病の障害は全くないか非常に軽微であり、且つ免疫抑制作用を示さなかった【マスケット(Muskett)、J. C. ら、ベテリナリー・リサーチ(Vet. Res.)、104:332-334(1979)】。これらの弱毒化されたワクチンは移行抗体のない雛には非常に有効であった。ところが、移行抗体をもった雛にはワクチンが無効化される事が至る所で報告され始めた【マスケット(Muskett)、J. C. ら、ベテリナリー・リサーチ(Vet. Res.)、104:332-334(1979)、イデ(Ide)、P. R.、カナディアン・ベテリナリー・ジャーナル(Can. Vet. J.)、20:35-40(1979)、ウッド(Wood)、G. W. ら、アビアン・パソロジー(Avian Path.)、10:365-373(1981)】。

【0007】これらの結果は、弱毒化ワクチンの使用に関してジレンマを生じさせている。即ち、自分で抗体を産生できない頃の幼雛には親を免疫して移行抗体で病気を防止できるが、移行抗体のある雛をワクチンで免疫することはできないので、移行抗体の消失する頃からの感染が問題になる。一方、移行抗体のない幼雛は抗体産生のできる頃からの免疫は可能であるが、それ以前の頃の感染が問題になる。また、移行抗体のある幼雛に対しては病原性の残っているワクチン株を使うことにより、免疫を与えることが可能であるが、実際には野外で移行抗体のレベルを1羽毎に測定するのは不可能であり、すべての鶏にこのワクチンを投与すると移行抗体価の低い個体にワクチン自身の副作用が現れてしまう弊害がある。

【0008】(2) 診断法

IBDVの診断は通常ファブリキウス病からのウイルス分離と血清学的な試験によって行なわれている。血清学的診断法としてはファブリキウス病の乳剤を抗原として用いたゲル内沈降反応と蛍光抗体法が古くから用いられている【イデ(Ide)、P. R.、カナディアン・ジャーナル・オブ・コンパラティブ・メディシン(Can. V. Comp. Med.)、39:183-190(1975)】。また、ウイルス中和抗体価の測定も診断法として利用されている【フィリップス(Philipps)、W. E. Jr.、アビアン・ディジーズ(Avian Disease)、25:1093-1097(1981)】。高感度血清診断法としてELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)も近年ではよく利用されている【マークット(Marquardt)、W. W. ら、アビアン・ディジーズ(Avian Disease)、24:375-385(1980)】。迅速で簡単で再現性の高い判定方法として向流電気泳動法も試みられて

いる【バーグ(Berg)、N. W.、アビアン・パソロジー(Avian Path.)、11:611-614(1982)】。

【0009】ウイルスの検出や量を測定する手段として、鶏に感染させID₅₀を求める方法や発育鶏卵に感染させEID₅₀が用いられている。近年、より短時間で感度よく測定できる方法としてウイルスの核酸を検出するDNAプローブ法が報告されている【デイビス(Davis)、V. S. とボイル(Boyle)、J. A.、アビアン・ディジーズ(Avian Disease)、34:329-335(1990)、ヘンダーソン(Henderson)、K. S. とジャックウッド(Jackwood)、D. J.、アビアン・ディジーズ(Avian Disease)、34:744-748(1990)、ジャックウッド(Jackwood)、D. J.、ベテリナリー・マイクロバイオロジー(Vet. Microbiol.)、24:253-260(1990)】。また、この技術の延長としてPCR(Polymerase Chain Reaction)の応用も考えられている【デイビス(Davis)、V. S. とボイル(Boyle)、J. A.、アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)、189:35-39(1990)】。

【0010】(3) 組換えウイルス

IBDVの主要なウイルス構成蛋白質をコードする第一分節の遺伝子配列はいくつかの株で報告されている【ハドソン(Hudson)、P. J. ら、ヌクレオト・アシッド・リサーチ(Nuc. Acid Res.)、14:5001-5012(1986)、キーベンジ(Kibenge)、F. S. B. ら、ジャーナル・オブ・ジェネラル・ビロロジー(J. Gen. Virol.)、71:569-577(1990)、ペイラス(Bayliss)、C. D. ら、ジャーナル・オブ・ジェネラル・ビロロジー(J. Gen. Virol.)、71:1303-1312(1990)】。その内、IBDVの002-73株のcDNA断片が大腸菌【アザッド(Azad)、A. A. ら、ビロロジー(Virology)、149:190-198(1986)、アザッド(Azad)、A. A. ら、ビロロジー(Virology)、161:145-152(1987)、特表平3-500601】や酵母【マックリディ(Macreadie)、I. G. ら、ワクチン(Vaccine)、8:549-552(1990)】を宿主として蛋白質発現に用いられている。発現した蛋白質はいずれも有効成分としてVP2蛋白質あるいはその一部を含み、鶏にウイルス中和抗体を誘導することができ、この抗体を受動的に他の鶏に移すとその鶏をIBDVの感染から防御することが報告されている。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】従来の方法によるIB

DVのワクチン製造には、生ワクチンと不活性ワクチンの2種類の物がある。生ワクチンの場合は接種量が少なくてすむという長所があるものの、厳密な安全性と有効性及び使用方法の検討が重要になる。一方、不活性ワクチンの場合は安全性が高いという長所があるが、ウイルスの有効成分を破壊せずに効果的に不活性する検討や十分な免疫を与えるためにはかなりの量が必要になり、最小有効量試験が重要になる。こういった基準を達成して、使用されている現在のワクチンは疾病の予防に効果をあげているものの、依然として小数の鶏には生ワクチン使用による副作用や不十分な不活性ワクチン接種による病気の発生が知られている。また、企業努力による製品の価格低下にも、このような時間と人手のかかる製法では限界があると考えられる。また、最近野外では接種にかける手間を減らすために多価ワクチンを望む声が大きい。そうした多価ワクチンに対応するためには効力が高く、安定性があり、安全性の高いワクチン製造が必須になるが、こうしたワクチン開発はかなり高価なものになろう。

【0012】また、現在のIBDV検査の主流は中和抗体値の検査とELISAであるが、中和抗体の測定は非常に感度が高く、特異性が高いという長所があるものの、鶏胚初代継代細胞を使うため、簡便性にかける欠点がある。また、この検査には数日を要し、たとえば、中和抗体検査に使うウイルスと実際に鶏が感染したウイルスが抗原的にかけ離れていると検定できないという欠点を持っている。ELISAによる抗体検査は簡便で再現性が高く、比較的中和抗体値との関連も高いということで利用が多い。ところが、ELISAに用いる抗原にはIBDVを増やして抗原を調製しているため、いくつかの問題点が指摘できる。非特異的な抗体との反応を防ぐためにはウイルスをかなり精製しなければならないが、安定的に高純度のウイルスを製造することは困難であり、できても非常に高いものになってしまう。現在、核酸を利用した優れたウイルス同定法が開発されているが、こういった技法は実験室レベルでの診断には利用されるだろうが、実際には野外を含めて抗体検査の方が需要は大きい。

【0013】組換えDNA技法は感染ウイルスを使わないで安全に大量のワクチンを製造できる方法であるが、現在の報告段階では量的にも、効力的にも不十分であり、おおいに改良の余地がある。

【0014】そこで以上のような問題点を鑑み、本発明者はかかる従来技術の下で、鋭意研究を重ね、IBDVの不活性ワクチンであるIQ株の第1分節遺伝子のcDNAを作製し、組換えバキュロウイルスを築築した。組換えバキュロウイルス感染細胞内では挿入したIBDV由来遺伝子からの蛋白質の発現が見られた。この蛋白質は感染細胞中に蓄積するのみならず、培養上清に粒子状に産生されることを見い出した。すなわち、IBDV

cDNA組換えバキュロウイルス感染細胞の培養液中には、粒子状に自己集合したIBDV抗原蛋白質が多量に放出されていた。この粒子を鶏に免疫原として接種したところIBDVの感染から鶏を防御することが認められた。また、同様にこの粒子をELISAの抗原として用いたところ、IBDVに対する中和抗体値とこのELISAの値に相関関係が高いことが見いだされた。かかる知見に基づいて本発明を完成するに至ったものであり、本発明の目的は、上記の手法に基づいて防御抗原性を有するIBDVの粒子状構成蛋白質の製法を提供するものである。

【0015】

【課題を解決するための手段】上記した目的の実現のためになされた本発明の防御抗原性を有するIBDVの粒子状構成蛋白質の製法の特徴は、IBDVの第1分節cDNAを組み込んだ組換えバキュロウイルスを感染させた細胞の培養上清中に発現蛋白質が自己集合した粒子が大量に放出され、この放出粒子にIBDVに対する防御免疫原性があるというものである。

【0016】本発明においてベクターに組み込まれる遺伝子はIBDVに分類されるウイルスならば特に株の限定はされないが、特には002-73株【フィルス(Firth)、K. J.、オーストラリアン・ベテリナリ-・ジャーナル(Aust. Vet. J.)、50:128-130(1974)、ST-C株【ローゼンバーガー(Resenberger)、J. K.ら、アビアン・ディジーズ(Avian Disease)19:717-729(1975)】、52/70株【バイグレイブ(Bygrave)、A. C. とファラーア(Faragher)、J. T.、ベテリナリ-・リコード(Veterinary Record 86:758-759(1970)】などの強毒株、ウズラや鶏の発育卵や培養細胞などに順化した弱毒株等があげられる。

【0017】本発明においてIBDV遺伝子とは、特にIBDVが有する2分節の2本鎖RNAゲノムのうちの長い方の分節、すなわち第1分節の全体、あるいはその一部または変異物や変形物をいい、実質的に自己開裂するウイルス蛋白質をコードしている塩基配列を示す。この遺伝子は特に感染臓器、感染培養細胞あるいはその上清から得たIBDVからcDNAを公知の方法により逆転写酵素を利用して逆転写して得たのではなくとも、化学的に人工合成したものであっても実質的にコードする遺伝子がIBDVの蛋白質に対応するものであれば構わない。

【0018】本発明において用いるベクターは、宿主細胞(菌)内で蛋白質を発現させることのできるものであれば特に限定はされながら、用いられるベクターの具体例としてはpGEM-EX、pTac、pKK233などの大腸菌発現ベクター、pPL-1などの大腸菌ファ-

ジ系ベクター、pSVL、pKSV、pMAMなどの大腸菌-培養細胞シャトルベクター、またはワクチニア、バキュロ等のウイルスベクターなどが例示される。

【0019】本発明においてIBDV遺伝子を組込んだ発現ベクターで形質転換された宿主細胞は、挿入した開裂蛋白質前駆体が発現され、自己開裂して各々の成熟蛋白質(VP2、VP3、VP4)へとプロセッシングされていく。自己開裂は大腸菌の内部でも【ジャガディッシュ(Jagadish)、M. N. ら、ジャーナル・オブ・ビロロジー(J. Virol.) 62:1084-1087(1988)】、真核生物の細胞内でも観察される。開裂した各々の蛋白質はIBDVが感染した鶏の細胞内でウイルス構成蛋白質が集合してウイルス粒子を作るがごとく自己集合して粒子を形成する。この時、宿主として大腸菌あるいは酵母を選んだ場合は細胞内に粒子が蓄積するが、動物培養細胞や昆虫細胞を選んだ場合は、IBDVが感染細胞から放出されるがごとく細胞培養液中に粒子が放出されてくる。宿主細胞の培養方法は細胞を培養できるものであるならば特に限定されないが、培養フラスコによる静置培養、ローラーポトルによる回転培養、スピナーフラスコ等による懸濁培養等が例示できる。

【0020】本発明における発現組換え蛋白質は細胞内または細胞培養液中あるいはその両方に得られ、この発現蛋白質の精製は発現蛋白質が自己集合して粒子を形成する性質を利用して遠心分離、ゲル通過カラム、電気泳動などの手法により簡単に単離することができる。発現組換え蛋白質をIBDV用ワクチンとして用いるには、特に濃縮あるいは精製の操作なしに感染細胞の抽出物あるいは感染培養上清をそのまま使用しても防御効果が得られるが、より好ましくは精製粒子を用いたほうがよい。鶏には公知の方法により免疫ができ、磷酸アルミニウムゲルアジュvant、水酸化アルミニウムゲルアジュvant、オイルアジュvantと混合して免疫する方法が例示できる。検査用の抗原として発現組換え蛋白質を用いるにも感染細胞の抽出物あるいは感染培養上清を用いることができるが、検査時の好ましからぬ反応をなくすために精製粒子の使用が勧められる。検査の方法としては抗原を固相化させたELISAによる発色あるいは発光による測定法、RIAによる放射活性測定法、ラテックス粒子による凝集反応法、対向電気泳動法、ゲル内沈降反応法などが例示される。

【0021】

【作用】特表平3-500601で示されたVP2単身、あるいはエピトープの1部を用いた利用法は抗原の安定性、あるいは抗原を精製する方法に困難が見いだされるが、本発明の粒子はより物理化学的に安定であり、より好ましくは精製が非常に容易な事である。このためワクチンとして利用するにあたって、いくつかの特長が容易に推定できる。

【0022】1. 構造がウイルス粒子と似通っているために抗原刺激が接種された動物に対してウイルス粒子で免疫したのと同様に効率的に行われる。

【0023】2. 安定な構造をしていることから接種された動物の体内で分解しにくく、抗原刺激がウイルス粒子で免疫したのと同様に長期にわたっておこなわれる。

【0024】3. 大量発現が可能だからより低価格でワクチンを製造できる。

【0025】4. 簡単な工程で濃縮できることから接種量の少ないワクチンを製造でき、接種労力が軽減される。

【0026】5. 簡単な工程で精製できることから接種時の好ましからざる副反応を抑えることができる。以上のような長所から、本組換え発現蛋白質を用いたワクチン製造法はワクチン製造会社とワクチン使用者に非常に有効な手段を提供するものである。

【0027】また、抗体検査試薬用抗原として利用するにあたっても同様にいくつかの長所が容易に推定される。

【0028】1. 大量の抗原を提供でき、多くの検査に対応できる。

【0029】2. 抗原の濃縮が簡単な工程でおこなえ、品質の均一性を保て、広範囲な検査法に応用できる。

【0030】3. 簡単な工程で精製できることから、供雑物による検査時の好ましからざる反応を抑えることができ、検査精度を向上させ得る。

【0031】4. 構造がウイルス粒子と似通っているために、ウイルス粒子を抗原に用いたときと同様に立体構造を認識するような抗体とも反応し、検査精度を落とすことはない。以上のうような特長から、本組換え発現蛋白質を用いた検査試薬用抗原製造法はIBDVワクチン非接種地域においては広範囲にIBDVの発生状況調査を、IBDVワクチン接種地域においては免疫が成立しているかどうかを調査する手段を提供するものである。

【0032】

【実施例】以下に本発明を図面に示す実施例に基づいて説明する。

【0033】なお本例では配列番号1の塩基配列を有するIBDVのIQ株を用いた。

【0034】(1) IBDV第一分節cDNAの作製
(図1参照)

培養細胞に順化したIBDVのIQ株を培養上清から遠心分離により精製し、プロテアーゼK消化後にウイルス遺伝子RNAを常法によりフェノール、クロロホルム抽出した。すでに報告されているIBDV各株の塩基配列 [ハドソン(Hudson)、P. J. ら、ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nuc. Acid Res.) 14:5001-5012(1986)、キンベンジ(Kibenge)、F. S. B. ら、ジャーナル・オブ・ジェネラル・ビロロジー(J. Gen. Vi

r o l .) 71 : 569-577 (1990) 、ペイリス (Bayliss) 、C. D. ら、ジャーナル・オブ・ジェネラル・ビロロジー (J. Gen. Virol 1.) 71 : 1303-1312 (1990)] を基に約500ベース間隔で18ベースのプライマーをDNA合成機 (ミリジエン社製) で自動化学合成した。このプライマーを用いてIBDVより抽出したRNAを鋳型として常法通りに逆転写酵素でcDNAを作製した。得られたcDNAを複製の忠実度にすぐれたペントDNAポリメラーゼ (ニューイングランドバイオラボ社製) を用いて、95°C 1分、50°C 2分、72°C 5分で15サイクルのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行いcDNAを増幅させた。この結果、IBDVの第一分節遺伝子は4つの部分的に重なりあったcDNAとして得られた。

【0035】(2) IBDV第一分節cDNAのクローニング (図1参照)

この増幅cDNAの末端をクレノ-酵素 (ベーリンガーマンハイム社製) で処理し、末端を平滑化し、続いてポリヌクレオチドカイネース (東洋紡社製) にて末端を磷酸化した。クローニングベクターとしてpGEM-3Z (プロメガ社製) を制限酵素Sma Iで完全消化後、バクテリアルアルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) を用いて末端を脱磷酸化させた。このベクターと増幅cDNAを等量混合しT4DNAライゲース (ベーリンガーマンハイム社製) を用いて結合させ、続いて大腸菌JM109株を形質転換させてそれぞれの組換え体を得た。4種類に分断されてクローニングされたcDNAをそれぞれに特異的な制限酵素を用いて常法に乗っ取って切断と再結合を繰り返し、ひとつながらにつなぎ合わされた再構築組換えベクターpGEM-VP0を得た。pGEM-VP0が正しく再構築されたかどうかはダイテオキシ法で塩基配列を決定することにより確認した。

【0036】(3) 組換えバキュロウイルス作製用トランスマーカーへの再クローニング (図2参照)

バキュロウイルストランスマーカー-pAcYM1を制限酵素Sma Iで切断後、バクテリアルアルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) を用いて末端を脱磷酸化させた (pAcYM1/Sma I/BAP)。pGEM-VP0を制限酵素EcoRIで切断後、末端をクレノ-酵素 (ベーリンガーマンハイム社製) で処理し、末端を平滑化した。さらに、IBDVのcDNA断片 (VP0) とpGEM部分をアガロースゲル電気泳動で分離し、VP0 DNA部分のみをゲルから単離した。pAcYM1/Sma I/BAPとVP0 DNAを等量混合し、常法に従い大腸菌を形質転換して組換え体pAcYM1-VP0を得た。

【0037】(4) 組換えバキュロウイルスの作出

252のカルチャーボトルに培養されたSf21細胞にバキュロウイルス (AcNPV) を0.1pfu/cell

11で細胞に感染させ、45分後に前記組換えプラスミドpAcYM1-VP0 DNAを磷酸カルシウム法で細胞にトランスフェクションした。その後、28°Cで96時間細胞を静置培養し、その培養上清を採取し4°Cで保存した。続いて、採取した培養上清を100倍から1万倍に希釈して、直径3.5のペトリ皿に培養したSf21細胞、約106個に感染させ、1.5%のアガロースゲルを重層した。72時間静置培養後、上から0.5%ニュートラルレッドを滴下し、さらに24時間培養を続けた。感染後、96時間でペトリ皿内の細胞にはウイルス感染による明瞭なブラックが出現した。組換えバキュロウイルスは外来遺伝子が挿入されるとポリヘドリン蛋白質の発現が無くなることから、ニュートラルレッドで染まらないポリヘドリン欠損ブラックをバスクールビペットで単離して、スクリーニングとクローニングをおこなった。続いて、得られた組換えバキュロウイルスのクローンをSf21細胞に再び感染させ、96時間後の感染細胞をSDS電気泳動にかけたところ、挿入した遺伝子に相当する産物が蛋白質のバンドとして認めらるることが確認され、このクローンをrAcNPV-VP0と命名した。

【0038】(5) 組換えバキュロウイルスの発現

rAcNPV-VP0をSf21細胞に10pfu/cellで感染させると24時間目から48時間にわたって感染細胞内、培養上清に多くの発現蛋白質が認められた。発現した蛋白質はジャガディッシュ (Jagadish) 、M. N. ら [ジャーナル・オブ・ビロロジー (J. Virol) 62 : 1084-1087 (1988)] が大腸菌で報告したのと同様に感染Sf21細胞内でも前駆体蛋白質 (VP0) が自己開裂し、それぞれの蛋白質 (VP2、VP3、VP4) に成熟していることが認められた (図3Aレーン2)。これらの蛋白質はIBDVに感染した鶏の血清と反応することから (図3Bレーン5と7参照)、もともとのウイルスの抗原性を保持していると考えられた。このような蛋白質は非感染のSf21細胞 (図3Aレーン3参照) や野生型のバキュロウイルス感染細胞 (図3Aレーン1参照) にはいっさい認められなかった。さらに、培養上清中に見られる蛋白質も同様に成熟しており、細胞内で自己開裂した後、細胞外に放出されたと考えられた (図3Bレーン2と6参照)。この培養液中にみられる成熟蛋白質は15000回転、15分の遠心で沈殿部分に回収されることから、塊をつくっていることが推定された。そこでこの培養上清を15%と60%のシェーカロースステップ密度勾配に重層し、TST28ローター (コントロン社製) で25000回転で2時間遠心した。遠心後、各分画に組換え蛋白質があるかどうかをSDS-ゲル電気泳動にて確認したところ、最上層分画 (図4レーン5参照) や15%層分画 (図4レーン6参照) には認められなかつたが、60%層分画には組換え蛋白質が認められた

(図4レーン7参照)。このような蛋白質は野生型のバキュロウイルス感染細胞の培養上清を同様の処理しても見られなかった(図4レーン2~4参照)。そこで、この分画を常法によりメンブラン上でネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察したところ、非常に大きな中空の粒子構造が認められた(図5A~C参照)。このような粒子は同様な精製方法で得られるバキュロウイルス粒子(図5D~E)とは異なっており、発現蛋白質由来であることが判った。

【0039】(6) 発現粒子構造物の防御免疫原性(表1参照)

A c N P V - V P 0 感染細胞の培養上清を48時間後に採取して遠心分離し、粒子構造物を粗精製した。これを抗原として3週齢のSPF鶏(日生研社製)4羽に10 μ gを、さらに4羽にはその1/10量の1 μ gをフロインドのコンプリートアジュvantと併に初回免疫した。また、陽性対照として市販のIBDV不活化ワクチン(日生研社製)を用法に従って鶏4羽に免疫し、陰性対照として非免疫鶏4羽を他に準備した。2週後に再び同様に2回目の免疫を行った。その2週後に50EID₅₀

10

20

表 1

のIBDVで全鶏を攻撃した。攻撃後、1週目に鶏を解剖し、攻撃ウイルスによるファブリキウス囊(以下「F囊」と略記する)の組織病変を比較した。

【0040】非免疫鶏4羽はいずれも攻撃により著しいF囊の萎縮が認められ、F囊体重比は1.4から2.4の値を示した。一方市販のIBDVワクチンを接種した4羽中3羽はまったく萎縮が認められず、F囊体重比は3.5から9.1の値を示し、病理学的にも正常であった。残りの1羽はわずかながら萎縮が認められたものの組織の色は正常と変わり無かった。発現粒子10 μ gで免疫した鶏4羽はいずれもF囊の萎縮は認められず、F囊体重比は4.5から12.5の値を示した。発現粒子1 μ gで免疫した鶏4羽については、その内2羽にはF囊の萎縮が認められなかつたが、残りの2羽には萎縮が認められた。のことより、組換えにより発現した粒子構造物は鶏にIBDVに対する防御能を付与することが明かとなった。また、その防御能の与え方には抗原量依存性があることが示された。

【0041】

【表1】

実験群		体重 ^{*1}	F囊重量 ^{*2}	F囊体重比 ^{*3}	防御
非免疫 陰性対照群	1	0.88	2.04	2.32	0/4
	2	0.60	1.30	2.17	
	3	0.57	1.38	2.42	
	4	0.70	0.98	1.40	
組換え蛋白質 1 μ g免疫群	1	0.59	1.20	2.03	2/4
	2	0.79	2.43	3.08	
	3	0.62	2.91	4.69	
	4	0.82	1.77	2.21	
組換え蛋白質 10 μ g免疫群	1	0.75	3.37	4.49	3/4
	2	0.59	7.40	12.50	
	3	0.82	4.71	5.74	
	4	0.71	4.14	5.84	
市販ワクチン 接種陽性対照群	1	0.60	3.36	5.60	4/4
	2	0.63	5.75	9.13	
	3	0.79	2.14	2.71	
	4	0.70	2.43	3.47	

*1: 体重はkg単位で示してある。

*2: F囊重量はg単位で示してある。

*3: F囊体重比はF囊重量(g)を体重(kg)で割った値である。

13

【0042】(7) 発現蛋白質を用いた抗体検査(表2参照)

r A c N P V - V P 0 を感染させた S f 2 1 細胞の培養上清を 48 時間目に採取し、同様に遠心分離により発現組換え粒子構造物を精製した。この蛋白質を常法に従い E L I S A 用プレート(ファルコン社製)に一つの穴(ウエル)あたり $0.1 \mu\text{g}$ になるように 5.0 mM 炭酸緩衝液で希釈し、凍結乾燥法でプレートに抗原を固相化した。使用直前に 3% スキムミルクで各ウエルを 37°C、1 時間ブロッキングしたのち、抗体検査に用いた。

用いた抗体として予め中和抗体価の解っている鶏免疫血清を使用した。それぞれの中和抗体価は常法によりブロック減少法により測定した。

【0043】ブロッキング液を洗い流した後、それぞれの抗体を生理磷酸緩衝液(PBS)で 200 倍から 2 倍段階希釈し、各ウエルに $50 \mu\text{l}$ づつ加え、37°C、1 時間反応させた。続いて、抗体希釈液を洗い流し、西洋*

14

*ワサビのペーオキシダーゼ(HRPO)標識された抗鶏イムノグロブリン抗体を加え、再び 37°C で 1 時間反応させた。未反応の標識抗体を洗い流した後、酵素の発色試薬(A B T S)と過酸化水素を加えて発色させた。発色の程度はプレートリーダー(インターメット社製)を用いて測定した。その結果、中和抗体価 4096 倍の鶏血清では 80.0 倍希釈までが非常に強く反応し、測定値は 2 以上になった。一方、中和抗体価 1024 倍の鶏血清は 20.0 倍希釈までが非常に強く反応し、測定値は 2 以上になった。ところが、中和抗体価 4 倍以下の鶏血清は 20.0 倍希釈ではほとんど発色を示さなかった。以上の事から I B D V に対する抗体価を測定するための抗原としてもこの組換え発現蛋白質は有効であることが判明した。

【0044】

【表2】

表 2

鶏個体番号	中和抗体価	血 清 希 釈 倍 率					
		200	400	800	1600	3200	
1	4096	>2	>2	>2	>2	>2	1.9
2	4096	>2	>2	>2	1.6	1.1	
3	4096	>2	>2	>2	>2	1.5	
4	1024	>2	1.9	1.4	0.9	0.6	
5	4	1.4	1.0	0.6	0.5	0.4	
6	<4	1.4	0.9	0.5	0.4	0.3	
7	<4	0.8	0.6	0.4	0.3	0.3	
8	<4	0.7	0.6	0.4	0.3	0.3	

各血清希釈における値は E L I S A の結果現れた発色の度合を吸光度計(プレートリーダー)で測定した値である。

【0045】

配列の型: 核酸

【配列表】配列番号: 1

配列

10	20	30	40	50	60
AGTAGAGATCAGACAAACGATCGCAGCGATGACAAACCCGTCAAGCTAACAGAT					
Met Thr Asn Pro Ser Asp Gln Ala Gln Glu Ile					
70	80	90	100	110	120
TGTCCGTTTATACGGAGCCTCTGATGCCAACAAACCGGACCGGCGTCATTCCGGACGA					
Val Pro Phe Ile Arg Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp					

15

16

130 140 150 160 170 180
 CACCCCTGGAGAACACTCTCAGGTCGGAGACTTCAACCTACAATTGACTGTGGGGAA
 ThrLeuGluLysHisThrLeuArgSerGluThrSerThrTyrAsnLeuThrValGlyAsp
 190 200 210 220 230 240
 CACAGGGCTAGGGCTAATTGTCTTCTCCCTGGATCCCTGGATCAATTGTGGGTCTCA
 ThrGlySerGlyLeuIleValPhePheProGlyPheProGlySerIleValGlyAlaHis
 250 260 270 280 290 300
 CTACACACTGCAGAGCAATGGGAACTACAAGTTCGATCAGATGCTCTGACTGCCAGAA
 TyrThrLeuGlnSerAsnGlyAsnTyrLysPheAspGlnMetLeuLeuThrAlaGlnAsn
 310 320 330 340 350 360
 CCTACCGGCCAGTTACAACACTGCAAGGTTAGTGAGTCGGACTCTCACAGTGAGGTCAG
 LeuProAlaSerTyrAsnTyrCysArgLeuValSerArgSerLeuThrValArgSerSer
 370 380 390 400 410 420
 CACACTCCCTGGTGGCGTTATGCACTAAACGGCACCGTAAACGCCGTGACCTTCAAGG
 ThrLeuProGlyGlyValTyrAlaLeuAsnGlyThrValAsnAlaValThrPheGlnGly
 430 440 450 460 470 480
 AAGCCTGAGTGAACTGACAGATGTTAGCTACAATGGGTGATGTCGAAACGGCCAACAT
 SerLeuSerGluLeuThrAspValSerTyrAsnGlyLeuMetSerAlaThrAlaAsnIle
 490 500 510 520 530 540
 CAACGACAAAATTGGGGATGTCCTGGTAGGGGAAGGGTCACCGTCTCAGCCTACCCAC
 AsnAspLysIleGlyAspValLeuValGlyGluGlyValThrValLeuSerLeuProThr
 550 560 570 580 590 600
 ATCATATGATCTTGGGTATGTCGCACTTGGTGACCCCCATTCTGGCTATAGGGCTTGACCC
 SerTyrAspLeuGlyTyrValArgLeuGlyAspProIleProAlaIleGlyLeuAspPro
 610 620 630 640 650 660
 AAAATGGTAGCCACATGTGACACGGAGTGACAGGCCAGAGTCTACACCATAACTGCAGC
 LysMetValAlaThrCysAspSerSerAspArgProArgValTyrThrIleThrAlaAla
 670 680 690 700 710 720
 CGATGATTACCAATTCTCATCACAGTACCAATCAGGTGGGTAACAACTCACACTGTTCTC
 AspAspTyrGlnPheSerSerGlnTyrGlnSerGlyGlyValThrIleThrLeuPheSer
 730 740 750 760 770 780
 AGCCAACATTGATGCCATCACAGCTAACGCTAACGGCTGGAGAGAGCTCGTGTCAAACAAAG
 AlaAsnIleAspAlaIleThrSerLeuSerValGlyGlyGluLeuValPheLysThrSer
 790 800 810 820 830 840
 TGTCATAGCCTGTACTGGCGCCACCATCTATCTTATAGGATTGATGGGACTACGGT
 ValHisSerLeuValLeuGlyAlaThrIleTyrLeuIleGlyPheAspGlyThrThrVal
 850 860 870 880 890 900
 AACCAACAGAGCTGGCGCGAACATGGGCTGACGACTGGCACCAATCCTATTCC
 ThrThrArgAlaValAlaAlaAsnAsnGlyLeuThrThrGlyThrAspAsnProIlePro
 910 920 930 940 950 960
 ATTCAATCTTGTGTTCCGACCCATGAGATAACCCAGCCAATCACATCCATCAAACCTGG
 PheAsnLeuValPheProThrHisGlnIleThrGlnProIleThrSerIleLysLeuGlu
 970 980 990 1000 1010 1020
 GATAATGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAAGCTGGGATCAGATGTCATGGTCGGCAAGTGG
 IleMetThrSerLysSerGlyGlyGlnAlaGlyAspGlnMetSerTrpSerAlaSerGly
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GAGCCCTAGCAGTGCACATCCATGGTGGCAACTATCCAGGGGCCCTCCGTCGGCAACT
 SerLeuAlaValThrIleHisGlyGlyAsnTyrProGlyAlaLeuArgProValThrLeu
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 AGTAGCCTACGAAAGAGTGGCAACAGGATCCGTCGTTACAGTCGCTGGGTGAGCAACTT

17

18

Val Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val Ser Asn Phe
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CGAGCTGATCCAAATCCCGAACACTAGCAAAGAACCTGGTTACAGAATAACGGCCGATTGA
 Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CCCAGGAGGCCATGAACACTACACAAAATTGATACTGAGTGGAGGGACCGTCTTGGCATCAA
 Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 GACCGTCTGGCCAACAAGGGAGTACACTGACTTGTGAGTACTTCATGGAAAGTGGCTGA
 Thr Val Trp Pro Thr Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CCTCAACTCTCCCCTGAAGATTGCGAGGACATTGGCTTCAGGACATAATCCGGCCAT
 Leu Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile Arg Ala Ile
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 AAGGAGGATAGCTGTGCCGGTGGTCTACATTGTCACCTGCGCTCAGGCTCCCTAGCCCC
 Arg Arg Ile Ala Val Pro Val Val Ser Thr Leu Phe Pro Pro Ala Ala Pro Leu Ala His
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 TCCAATTGGGAAGGGTAGACTACCTGCTGGGCATGAGGACAGCTGCTTCAGGGAC
 Ala Ile Gly Glu Gly Val Asp Tyr Leu Leu Gly Asp Glu Ala Gln Ala Ala Ser Gly Thr
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 TGCTCGAGCCCGTCAAGGAAAGCAAGAGCTGCCTCAGTCGCATAAGGCAGCTGACTCT
 Ala Arg Ala Ala Ser Gly Lys Ala Arg Ala Ala Ser Gly Arg Ile Arg Gln Leu Thr Leu
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 CGCCCGTGAAGGGTAGGGTAGCTCGCAATCTATTCCAGGTGCCAGAACATCCGT
 Ala Ala Asp Lys Gly Tyr Glu Val Val Ala Asn Leu Phe Gln Val Pro Gln Asn Pro Val
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTCGACGGATTCTGCTCACCTGGGTACTTCGCGGTGCACACAACCTCGACTCGT
 Val Asp Gly Ile Leu Ala Ser Pro Gly Val Leu Arg Gly Ala His Asn Leu Asp Cys Val
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GCTAAGGGTGGGCCACGCTATTCCCTGTGGTCATTACGACAGTGGAAAGACGCCATGAC
 Leu Arg Val Gly Ala Thr Leu Phe Pro Val Val Ile Thr Thr Val Glu Asp Ala Met Thr
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 ACCCAAAGCACTGAACAGCAAATGTTGCTGTCAATTGAAGGGTGCAGAAGACCTCCA
 Pro Lys Ala Leu Asn Ser Lys Met Phe Ala Val Ile Glu Gly Val Arg Glu Asp Leu Gln
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 ACCTCCATCTCAAAGAGGATCTTCATACGAACCTCTCCGGACATAGAGTCTATGGATA
 Pro Pro Ser Gln Arg Gly Ser Phe Ile Arg Thr Leu Ser Gly His Arg Val Tyr Gly Tyr
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 TGCTCCAGATGGGGCTTCCACTGGAGACTGGGAGAGACTACACTGTTGTCCTTAAAGA
 Ala Pro Asp Gly Val Leu Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asp Tyr Thr Val Val Pro Ile Asp
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 TCATGCTGGGACGACAGCATTATGCTGTCCAAAGACCCCATTCTCTTATTGTGGAAA
 Asp Val Trp Asp Asp Ser Ile Met Leu Ser Lys Asp Pro Ile Pro Pro Ile Val Gly Asn
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CAGTGGCAACCTAGCCATAGCCTACATGGATGTGTTGCGACCCAAAGTCCCATCCATGT
 Ser Gly Asn Leu Ala Ile Ala Tyr Met Asp Val Phe Arg Pro Lys Val Pro Ile His Val
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 GGCTATGACAGGAGACCTCAACGCTGGGGCGAGATTGAGAAAAGTAAGCTTCAGAACAC
 Ala Met Thr Gly Asp Leu Asn Ala Trp Gly Glu Ile Glu Lys Val Ser Phe Arg Ser Thr
 2110 2120 2130 2140 2150 2160

19

20

CAAGCTGCCACTGCACACCGACTTGGCCTCAGGTTGGCTGGTCCCGGAGCATTGATGT
 LysLeuAlaThrAlaHisArgLeuGlyLeuArgLeuAlaGlyProGlyAlaPheAspVal
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 AGACACCGGGCCAACGGCAACGTCATCAAACGTTCCCCACAATCCACGCCACTG
 AspThrGlyProAsnTrpAlaThrPheIleLysArgPheProHisAsnProArgAspTrp
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 GGACAGGCTCCCCTACCTCACCTCCATACCTCCACCCAAATGCAGGACGCCAGTACCA
 AspArgLeuProTyrLeuAsnLeuProTyrLeuProProAsnAlaGlyArgGlnTyrHis
 2290 2300 2310 2320 2330 2340
 CCTTGCCATGGCTGCATCAGAGTTCAAAGAGACCCCTGAECTCGAGAGCGCCGTAGAGC
 LeuAlaMetAlaAlaSerGluPheLysGluThrProGluLeuGluSerAlaValArgAla
 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 CATGGAAGCAGCAGCCAACGTTGGACCCACTATTCAAATCTGCACTCAATGTGTTCATGTG
 MetGluAlaAlaAlaAsnValAspProLeuPheGlnSerAlaLeuAsnValPheMetTrp
 2410 2420 2430 2440 2450 2460
 GCTGGAAGAGAAATGGGATTGTGTCGATATGGCCAATCTGCACTCAGCGACCCGAAACGC
 LeuGluGluAsnGlyIleValSerAspMetAlaAsnPheAlaLeuSerAspProAsnAla
 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 CCATCGGATGCGAAATTTCTTGCACACGACCACAAAGCAGGTAGCAAGTGCAGAAAGAGC
 HisArgMetArgAsnPheLeuAlaAsnAlaProGlnAlaGlySerSerGlnArgAla
 2530 2540 2550 2560 2570 2580
 CAACTACGGGACAGCAGGCTACGGAGTGGAGGCCGGGGCCCACTCCAGAGGAAGCTCA
 LysTyrGlyThrAlaGlyTyrGlyValGluAlaArgGlyProThrProGluGluAlaGln
 2590 2600 2610 2620 2630 2640
 GAGGGAAAAGATAACCGGATCTAAAGAAGATGGAGACTATGGGCATCTACTTTGCAAC
 ArgGluLysAspThrArgIleSerLysMetGluThrMetGlyIleTyrPheAlaThr
 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 ACCCGGAATGGGTAGCACTCAATGGCACCGAGGGCCAAGGCCGGCAGCTAAAGTACTG
 ProGluTrpValAlaLeuAsnGlyHisArgGlyProSerProGlyGlnLeuLysTyrTrp
 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 GCAGAACACACGGGAAATACCGGACCCAAACGAGGACTATCTAGACTACGTGCATGCAGA
 GlnAsnThrArgGluIleProAspProAsnGluAspTyrLeuAspTyrValHisAlaGlu
 2770 2780 2790 2800 2810 2820
 GAAGAGCCGGTGGCATCAGAAGAACAAATCATAAGGGCAGCCACGTCGATCTACGGGC
 LysSerArgLeuAlaSerGluGluGlnIleIleArgAlaAlaThrSerIleTyrGlyAla
 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 TCCAGGACAGGCAGGCCACCCAGGCTTCATAGACGAAGTTGCTAAAGTCTATGAAAT
 ProGlyGlnAlaGluProProGlnAlaPheTleAspGluValAlaLysValTyrGluIle
 2890 2900 2910 2920 2930 2940
 CAACCATGGCGTGGCCAAACCAAGAACAGATGAAAGATCTGCTCTGACTGCGATGGA
 AsnHisGlyArgGlyProAsnGlnGluGlnMetLysAspLeuLeuThrAlaMetGlu
 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 GATGAAGCATCGCAATCCCAGGCTGGCTCCACCAAGGCCAAGCCAAACCAATGCTCC
 MetLysHisArgAsnProArgLeuAlaProProLysProLysProAsnAlaPro
 3010 3020 3030 3040 3050 3060
 AACACAGAGACCCCTGGCGGCTGGGCGCTGGATCAGGACTGTCCTGATGAGGACCT
 ThrGlnArgProProGlyArgLeuGlyArgTrpIleArgThrValSerAspGluAspLeu
 3070 3080
 TGAGTGAGGCTCTGGAGTCTCCCGA
 Glu***

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は本発明の実施例におけるIBDVの第一分節cDNAのクローニングと組み換えベクターの構築手順を示したものである。すなわち、cDNAのクローニングには8種類のプライマー（図中三角矢印）を用い、A、B、CとDの4つの部分にわけて、第一分節RNA（LS-RNA）をcDNA化し、それぞれのcDNA断片はpGEMベクターにクローニングし、図中に表記してある制限酵素によるDNAの切断とT4DNAライゲースによるDNAの結合（ligation）を繰り返して、4つの断片を1つの断片（VP0）に再構築した事を示したものである。

【図2】図2は得られたIBDVのcDNA断片を組換えバキュロウイルス作製用トランスファーベクターに再構築する手順を示したものである。すなわち、図中に表記している制限酵素でcDNAを切り出した後、末端をクレノーゼ素（Klenow Enzyme）で平滑化（fill-in）し、トランスファーベクターに断片を挿入したことを示している。

【図3】図3は組換えバキュロウイルス感染細胞において産成される蛋白質を示したものであり、Aはクマシーブリリアントブルーで染色したSDS-12.5%ゲル電気泳動像を示している。図中レーン1は野生型バキュロウイルス感染細胞、レーン2は組換えバキュロウイルス感染細胞、レーン3は非感染細胞、レーン4は分子量マーカーを泳動したものである。Bは同様の電気泳動

10

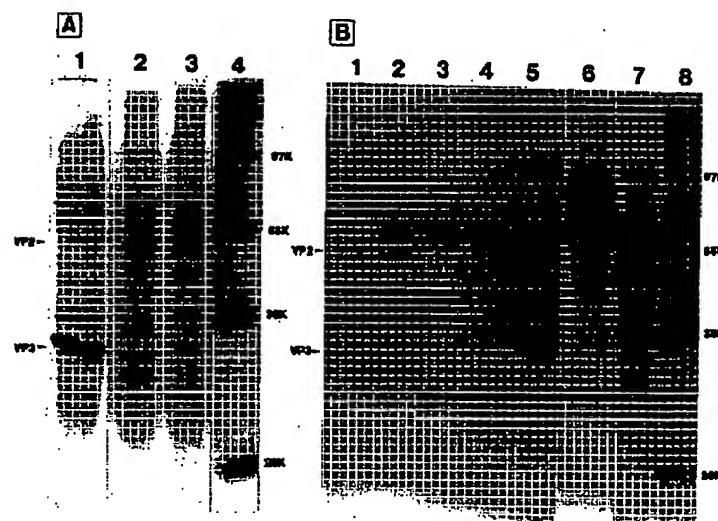
20

後、フィルターにウエスタンプロティングしたものであり、図中レーン1から5まではIBDV感染鶏血清と反応させたもので、レーン6から8までは抗体と反応させずにアミドブラックでフィルターを染色したものである。図中レーン2と6は組換えバキュロウイルス感染細胞の培養上清、レーン3は非感染細胞の培養上清、レーン4は非感染細胞、レーン5と7は組換えバキュロウイルス感染細胞、レーン8は分子量マーカーを泳動したものである。

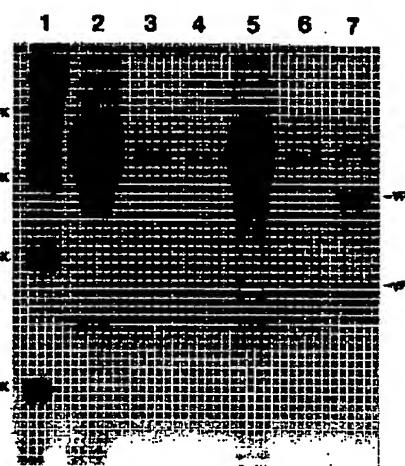
【図4】図4は組換えバキュロウイルス感染細胞の培養上清に産成される組換え蛋白質について遠心分離の結果を示したものであり、図中レーン2から4は野生型バキュロウイルス感染細胞の培養上清、レーン5から7は組換えバキュロウイルス感染細胞の培養上清を遠心分離後、SDS-12.5%ゲル電気泳動したものである。レーン1は分子量マーカー、レーン2と5は遠心の最上層分画、レーン3と6は15%シュークロース分画、レーン4と7は60%シュークロース分画をそれぞれ電気泳動したものである。

【図5】図5は組換えバキュロウイルス感染細胞培養上清に現れる粒子構造物をネガティブ染色後、電子顕微鏡で観察した結果を示している。図中AからCまでは組換えバキュロウイルス由来、DとEは野生型バキュロウイルス由来であり、図中の太線は500μmのスケールを表している。

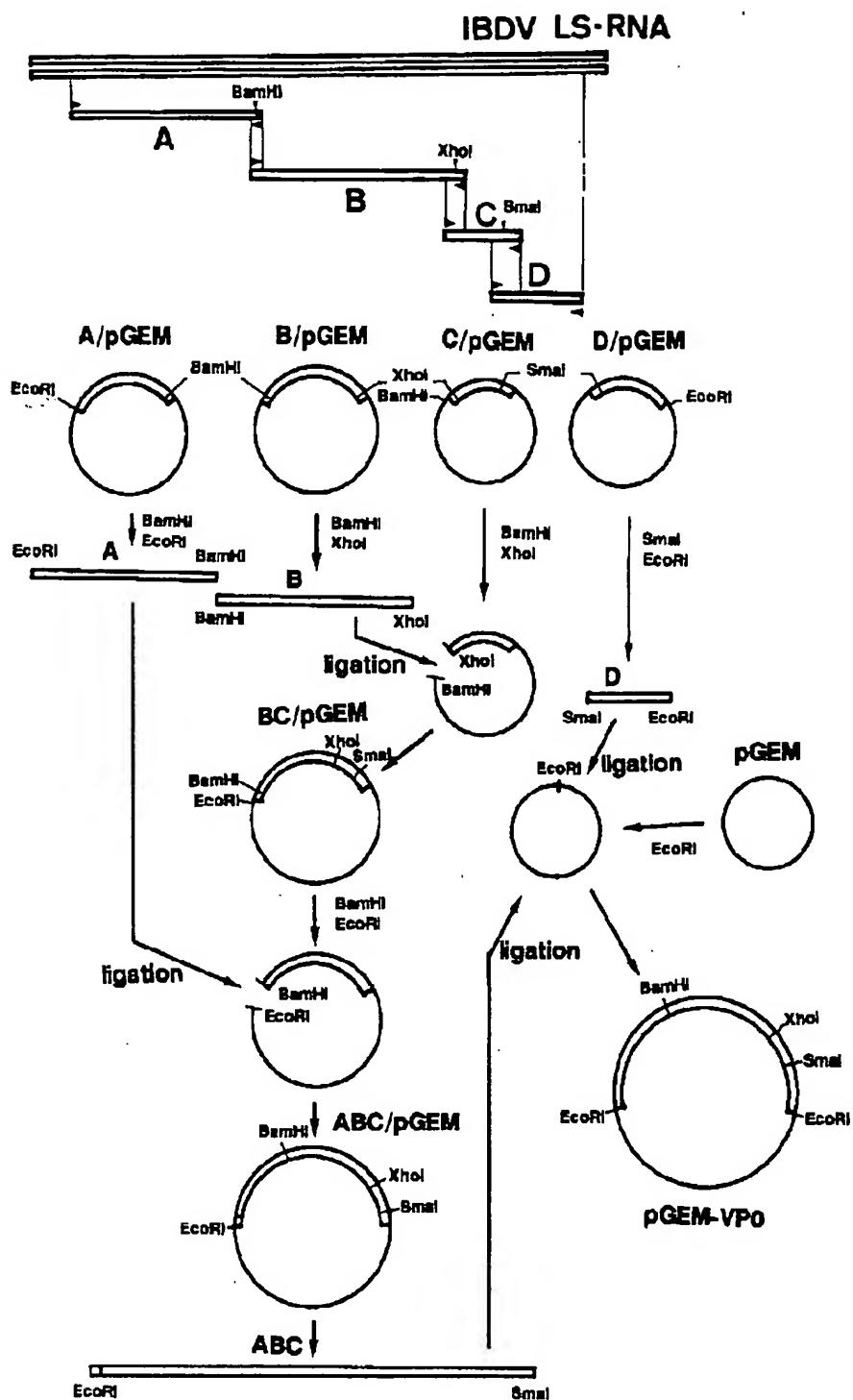
【図3】



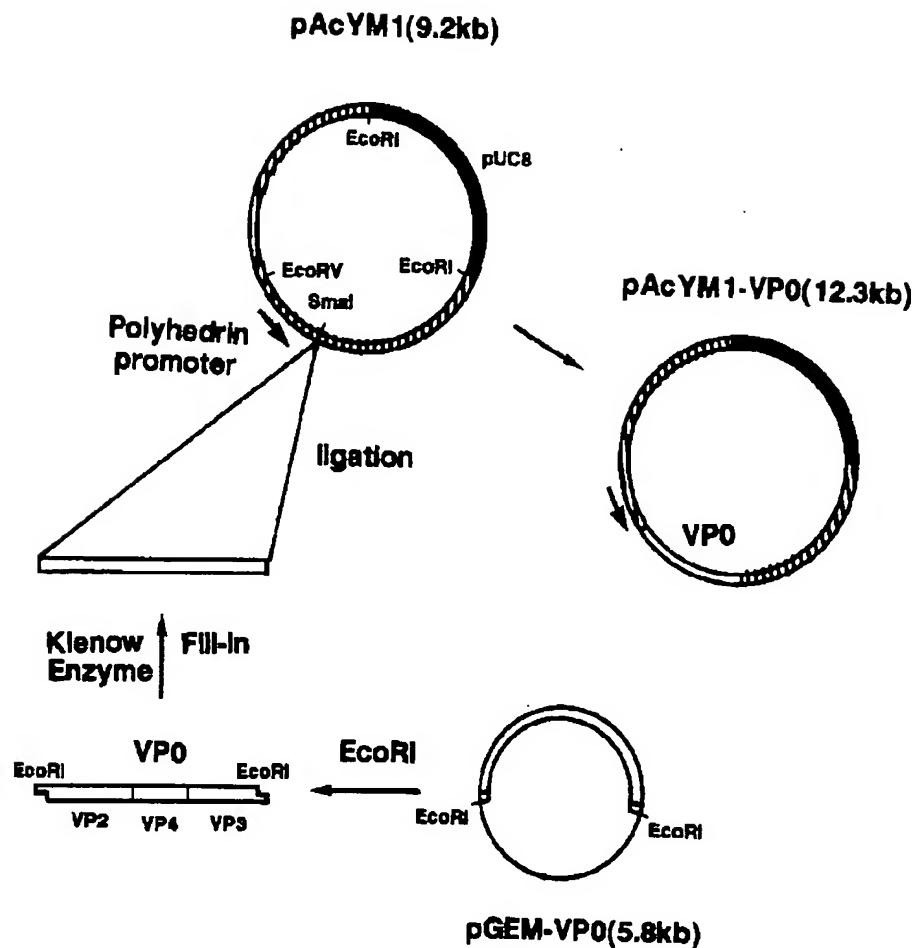
【図4】



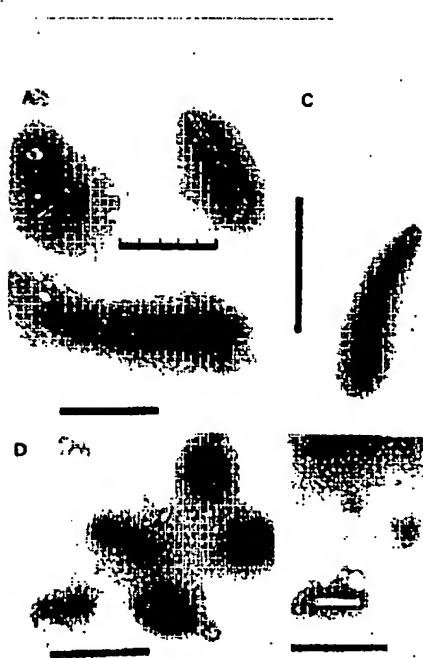
【図1】



[図2]



【図5】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
G 01 N 33/569		L 9015-2 J		
// C 12 N 15/41				
(C 12 P 21/02				
C 12 R 1:91)				

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.